PeAPA | Publicación Electrónica
ASOCIACIÓN PALEONTOLÓGICA ARGENTINA

www.peapaleontologica.org.ar

Estudio sobre el efecto de la temperatura en la técnica de calcinación para la obtención de silicofitolitos

SEBASTIÁN ARIEL FREZZIA[1,2]
NOELIA ISABEL PATTERER[1,2]
ALEJANDRO FABIÁN ZUCOL[1,2]
ESTEBAN PASSEGGI[1,2]

1. Laboratorio de Paleobotánica, Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la Producción (CICYTTP). España 149, E3105BWA Diamante, Entre Ríos, Argentina.
2. Facultad de Ciencia y Tecnología - Universidad Autónoma de Entre Ríos (FCyT-UADER). Ruta Provincial N°11, Km 10,5, E3100 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

Recibido: 25 de abril 2023 - **Aceptado:** 1 de agosto 2023 - **Publicado:** 23 de agosto 2023

Para citar este artículo: Sebastián Ariel Frezzia, Noelia Isabel Patterer, Alejandro Fabián Zucol y Esteban Passeggi (2023). Estudio sobre el efecto de la temperatura en la técnica de calcinación para la obtención de silicofitolitos. *Publicación Electrónica de la Asociación Paleontológica Argentina* 23(2): 97–113.

Link a este artículo: http://dx.doi.org/10.5710/PEAPA.01.08.2023.470

ISSN 2469-0228

Asociación Paleontológica Argentina
Maipú 645 1° piso, C1006ACG, Buenos Aires
República Argentina
Tel/Fax (54-11) 4326-7563
Web: www.apaleontologica.org.ar

Pe APA | Publicación Electrónica
ASOCIACIÓN PALEONTOLÓGICA ARGENTINA
Año 2023 - 23(2): 97–113
ARTÍCULO

ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA TÉCNICA DE CALCINACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE SILICOFITOLITOS

SEBASTIÁN ARIEL FREZZIA[1,2], NOELIA ISABEL PATTERER[1,2], ALEJANDRO FABIÁN ZUCOL[1,2] Y ESTEBAN PASSEGGI[1,2]

[1]Laboratorio de Paleobotánica, Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la Producción (CICYTTP). España 149, E3105BWA Diamante, Entre Ríos, Argentina.*sfrezzia@gmail.com*; *patterer.noelia@uader.edu.ar*; *cidzucol@gmail.com*; *epasseggi@gmail.com*

[2]Facultad de Ciencia y Tecnología - Universidad Autónoma de Entre Ríos (FCyT-UADER). Ruta Provincial N°11, Km 10,5, E3100 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

SAF: https://orcid.org/0000-0002-4987-7597; **NIP:** https://orcid.org/0000-0001-8405-8557; **AFZ:** https://orcid.org/0000-0001-5480-3456; **EP:** https://orcid.org/0000-0003-4061-0869

Resumen. Este trabajo da a conocer el análisis de la variación de tamaño y forma de silicofitolitos BILOBATE en hojas de *Arundo donax* L. procesados mediante calcinación a diferentes rangos de temperatura (específicamente a 500 °C, 650 °C, 800 °C y 950 °C). Las variables morfométricas aplicadas fueron de tamaño y forma (*e.g.*, longitud, ancho, perímetro, área, perímetro convexo, área convexa, factor de forma, redondez, convexidad, solidez y relación de aspecto). La asociación fitolítica para esta especie se caracterizó por la presencia de morfotipos ELONGATE, BULLIFORM FLABELLATE, BILOBATE, POLYLOBATE, CROSS, y estructuras estomáticas, tanto unicelulares como pluricelulares. La variabilidad fitolítica de hojas procesadas a 950 °C evidenció un menor recuento de CROSS y BILOBATE, y una mayor abundancia de silicofitolitos ELONGATE y BULLIFORM FLABELLATE. En tanto, los silicofitolitos BILOBATE articulados disminuyeron y los articulados del tipo BULLIFORM FLABELLATE aumentaron su frecuencia. Los morfotipos BILOBATE fueron seleccionados para análisis morfométricos por su alta frecuencia, demostrando que, procesados a 950 °C presentan cambios en coloración y alteraciones de forma indicados por altos valores de convexidad, solidez, factor de forma y redondez, y de tamaño representados por la reducción de perímetro. Estos resultados indicarían una tendencia en el cambio de tamaño expresada como una reducción del perímetro y variación de forma relacionado a una mayor esfericidad y convexidad de los morfotipos. Como complemento se realizó su observación mediante MEB y análisis de MEB-EDX demostrando pérdida de sílice en silicofitolitos procesados a 950 °C. El presente trabajo genera aportes para el conocimiento metodológico de procesamiento de material vegetal para extracción de silicofitolitos.

Palabras clave. Fitolitos. Morfometría*.* *Arundo donax* L. Bilobado. Calcinación.

Abstract. STUDY ON THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE CALCINATION TREATMENT TECHNIQUE FOR OBTAINING SILICOPHYTOLITH. This paper presents the analysis of the variation in size and shape of BILOBATE silicophytolith in leaves of *Arundo donax* L. processed by calcination at different temperature ranges (specifically at 500 °C, 650 °C, 800 °C, and 950 °C). The morphometric variables used were size and shape (*e.g.*, length, width, perimeter, area, convex perimeter, convex area, shape factor, roundness, convexity, solidity, and aspect ratio). The phytolith association for this species was characterized by the presence of ELONGATE morphotypes, BULLIFORM FLABELLATE, BILOBATE, POLYLOBATE, CROSS, and stomatal structures, both unicellular and multicellular. The phytolith variability of leaves processed at 950 °C showed a lower number of CROSS and BILOBATE and a greater abundance of ELONGATE and BULLIFORM FLABELLATE silicophytoliths. Meanwhile, the number of articulated BILOBATE phytoliths decreased and the articulated BULLIFORM FLABELLATE phytoliths increased. The BILOBATE morphotypes were selected for morphometric analysis because of their high frequency. When processed at 950 °C, they show color and shape variations, indicated by high values of convexity, solidity, shape factor and roundness, and size (represented by perimeter reduction). These results would indicate a trend in the change in size, expressed as a reduction in the perimeter, and a variation in shape, related to greater sphericity and convexity of the morphotypes. Complementary observations were made by SEM and SEM-EDS analysis, showing silica loss in silicophytoliths processed at 950 °C. The present work contributes to the methodological knowledge of processing plant material for silicophytolith extraction.

Key words. Phytoliths. Morphometry. *Arundo donax* L. Bilobate. Calcination.

LOS SILICOFITOLITOS se caracterizan por ser una valiosa herramienta para el estudio y la caracterización de la flora actual, lo que a su vez nos brinda una interpretación de la flora del pasado a través del análisis de dichos restos vegetales fósiles. Este análisis ha sido fundamental para describir la diversidad de la biota actual y ha demostrado su aplicabilidad en estudios arqueológicos y paleontológicos en diversas regiones del mundo. Los silicofitolitos se forman en los tejidos de las plantas como resultado de la precipitación del ácido monosilícico (H_4SiO_4) que se extrae mediante las raíces de la solución edáfica retenida por el suelo, la funcionalidad de estos depósitos es dar soporte estructural, de-

fensa contra herbívoros y resistencia a patógenos a las plantas, entre otras (Epstein, 2009; Cooke *et al.*, 2016; Katz, 2019). Después que la planta muere y el material orgánico vegetal se descompone, los silicofitolitos se depositan en el suelo, siendo una característica distintiva de los mismos sus posibilidades de preservación en un amplio espectro de condiciones (Piperno, 2006). Los silicofitolitos pueden proporcionar a los investigadores información importante, especialmente en contextos en los que no hay otros restos vegetales o éstos están mal preservados (Pearsall, 1989; Piperno, 2006).

En las últimas décadas, el análisis de silicofitolitos ha ganado relevancia como una herramienta de investigación cada vez más utilizada. En investigaciones recientes, se han aplicado análisis morfométricos para detectar posibles cambios de tamaño y forma de silicofitolitos, ya sea debido a su estado de preservación o a su filogenia. Estudios realizados por autores como Ball *et al.* (1993) y Lu *et al.* (2009) han demostrado que morfotipos encontrados en diferentes partes de un órgano vegetal pueden presentar diferencias morfométricas y variaciones en la frecuencia de diferentes morfotipos fitolíticos. Ball *et al.* (2009) han realizado estudios morfométricos para definir la taxonomía de fitolitos en cebada y trigo, y además Ball y Brotherson (1992), han demostrado la potencial influencia del ambiente en la morfología de los microrrestos vegetales. Out y Madella (2015) realizaron análisis morfométricos para diferenciar especies taxonómicamente según la forma de los silicofitolitos. También exploraron cómo los contextos ambientales influyen sobre la forma de estos cuerpos silíceos. En su estudio, lograron distinguir especies de gramíneas, como *Pennisetum glaucum* (Hitchcock, 1951), *Sorghum bicolor* (Moench, 1794), *Panicum miliaceum* (Correll y Johnston, 1970) y *Setaria italica* (Beauv, 1812; Pensiero, 1999). Además, notaron que una población de *P. glaucum* cultivada en un clima diferente presentaba diferencias en las medidas en morfotipos bilobados. Los autores (Out y Madella, 2016) también investigaron la morfometría de silicofitolitos en gramíneas, y demostraron que el cambio de forma de estos cuerpos silíceos se relaciona con la filogenia en diferentes subfamilias, tribus, géneros y especies.

Por otra parte, Ball *et al.* (2017) examinaron la variabilidad de formas en morfotipos elongados de las tribus Triticeae y Aveneae. Como resultado, lograron distinguir entre los diferentes taxones al identificar morfotipos con una longitud media distinta.

En otro estudio, Benvenuto *et al.* (2015) analizaron características morfológicas en morfotipos globulares con el fin de diferenciar subfamilias y familias botánicas. Examinaron aspectos como tamaño, redondez, reniformidad, número, longitud y densidad de espinas. Los resultados obtenidos les permitieron discriminar entre dos subfamilias de las Arecaceae, así como entre familias Bromeliaceae, Cannaceae y Zingiberaceae. Además, Patterer (2014) mediante análisis biométrico de silicofitolitos globulares logró diferenciar las subfamilias Arecoideae y Coryphoideae.

Actualmente, no existe registro sobre estudios metodológicos de extracción de silicofitolitos a partir de plantas actuales evaluadas desde un punto de vista morfométrico. La extracción de silicofitolitos suele realizarse mediante dos conjuntos de técnicas metodológicas: digestión química y calcinación. El procedimiento de digestión química aplica fuertes agentes oxidantes para digerir el componente orgánico, dejando libres los cuerpos silíceos del material orgánico vegetal procesado; por otro lado, la calcinación se basa en incineración de tejido vegetal en altas temperaturas dentro de un rango dónde los silicofitolitos se mantengan inalterados. Autores como Jones y Milne (1963) y Rovner (1971, 1972), mencionan que utilizar procesamientos dónde se apliquen altas temperaturas mediante técnicas de calcinación (pueden ser de hasta 800 °C) producen distorsiones y deformaciones en los silicofitolitos debido a que se acercan demasiado a la temperatura dónde la sílice opalina cristaliza en cristobalita y tridimita, la cual es de aproximadamente a 1150 °C.

Otros autores indican que el procedimiento de calcinación puede provocar la pérdida de agua del retículo de ópalo silíceo, un cambio de la densidad y del índice de refracción (IR) de los fitolitos, sumado a deformaciones en la morfología de los morfotipos cuando se utilizan temperaturas superiores a 500–600 °C durante un período prolongado (Jones y Milne, 1963; Jones y Segnit, 1969; Parr *et al.*, 2001; Elbaum y Weiner, 2003; Parr, 2006).

Además, Lanning *et al.* (1958) han demostrado la presencia de cristobalita en algunas muestras de lantana y sorgo que se calcinaron a temperaturas cercanas a los 900 °C. Estos autores sugieren que el material debe calentarse

a una temperatura lo más baja posible para evitar la conversión de la sílice en alguna forma distinta a la que estaba realmente presente en la planta. Boyd (2002) ha deducido el cambio de color y la producción de inclusiones de carbono en los silicofitolitos utilizando temperaturas entre 300–500 °C para calcinar el material vegetal. Sin embargo, otros estudios han demostrado que, a temperaturas menores de 500 °C, los cambios de color en fitolitos de sílice después de la incineración en un horno de mufla y lavado ácido son poco comunes (Jones y Milne, 1963; Bowdery, 1989; Runge, 1998; Parr *et al.*, 2001; Wallis, 2003).

En referencia a la coloración de los silicofitolitos, Elbaum y Weiner (2003) han presentado, en el marco de estudios fitolíticos en contextos arqueológicos, un método para distinguir silicofitolitos quemados de los no quemados mediante la medición de IR, aquellos quemados en altas temperaturas evidencian un desplazamiento hacia un mayor IR. Los morfotipos expuestos a temperaturas superiores a 500 °C durante varias horas se identificaron fácilmente como quemado, en cambio, el material vegetal expuesto a temperaturas de 200 °C no afectó su IR. Por otro lado, los morfotipos fitolíticos mostraron distorsión en su coloración cuando se calentaron a 900 °C.

Wu *et al.* (2014), utilizando microscopio electrónico de barrido (MEB) vinculado a espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX), evidenciaron que la estabilidad estructural de fitolitos ante diferentes rangos de temperatura de calcinación está relacionada con su composición atómica elemental. Definen que la distribución de potasio y calcio en silicofitolitos de hoja de arroz dio lugar a una variabilidad en el comportamiento de fusión de dichos biominerales expuestos a diferentes rangos de temperatura, indicando que a 900 °C podría causar que la forma del fitolito varíe uniformemente.

Por dichos antecedentes mencionados, resulta pertinente estudiar la técnica de extracción de silicofitolitos mediante calcinación a partir de plantas actuales utilizando morfometría geométrica y análisis MEB-EDX. Este procedimiento resulta clave para obtener referencias de tamaño y forma de cada silicofitolito, y con ello, analizar de manera adecuada los morfotipos en estudios de diferentes contextos como taxonómicos, tafonómicos, paleobotánicos y arqueológicos.

Se propuso para el presente trabajo el procesamiento de hojas de *Arundo donax* L. para su análisis. Las hojas de esta planta presentan una asociación fitolítica distintiva, que incluye morfotipos de gran tamaño como BULLIFORM FLABELLATE, ELONGATE espinosos, con contornos sinuosos y lisos. Además, se encuentran silicofitolitos más pequeños, como CROSS, POLYLOBATE y BILOBATE, siendo estos últimos los más abundantes según lo reportado por Chauhan *et al.* (2011).

La especie *A. donax* pertenece a la Familia Poaceae, es una hierba alta y perenne la cual forma densos cañaverales en lugares alterados, dunas de arena, humedales y hábitats ribereños. Esta especie es originaria de Asia y ha colonizado la región mediterránea, África y América (Chauhan *et al.*, 2011). En Argentina, se han registrado poblaciones de *A. donax* en diferentes provincias, incluyendo Entre Ríos (Zuloaga *et al.*, 2003).

El objetivo principal de este trabajo fue analizar si existe cambio de tamaño y/o forma de silicofitolitos extraídos a diferentes temperaturas de calcinación, precisamente a 500 °C, 650 °C, 800 °C y 950 °C. Se seleccionaron dichas temperaturas con el fin de evaluar rangos térmicos cercanos a 1150 °C. Para evitar distorsiones bruscas de forma y tamaño, las cuales pueden ocurrir al superar los 1000 °C, se estableció un rango máximo de 950 °C. Además, se fijó un umbral mínimo de 500 °C para recopilar información significativa sobre la variabilidad morfométrica, lo que permitiría considerar la posibilidad, si fuera necesario, de realizar ajustes en la técnica de calcinación. Para ello, se aplicaron normas metodológicas propuestas por el Comité Internacional de Morfometría de Fitolitos (ICPM su sigla en inglés) detalladas por Ball *et al.* (2016) para realizar análisis morfométricos en fitolitos. Acompañado de la observación de morfotipos mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) y la caracterización de los componentes atómicos elementales en la superficie de los silicofitolitos por medio de un sistema de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX).

En el último tiempo se ha generado un gran avance en el uso de silicofitolitos en análisis biológicos, arqueológicos y paleontológicos, por ello, se suma la necesidad de analizar desde la morfometría geométrica el correcto manejo del procesamiento en la etapa de calcinación para realizar

posteriores inferencias botánicas de manera correcta, como también, aportar a la gran área de estudio patrones de desgaste y/o alteraciones de silicofitolitos ante agentes externos, en este caso la temperatura.

MATERIALES Y MÉTODO

Área y materiales de estudio

La toma de muestras foliares de *A. donax* se realizó en un cañaveral localizado en la ciudad de Oro Verde, Provincia de Entre Ríos, Argentina (Fig. 1.1–2). El área de estudio se encuentra al Centro Oeste de la Provincia de Entre Ríos y fitogeográficamente corresponde a la región Neotropical, subregión Chaqueña, dominio Chaqueño, el cual posee incidencia de tres provincias fitogeográficas por la existencia de corredores biológicos: Chaco, Esteros del Iberá y Pampeana (Arana *et al.*, 2021). El sitio de toma de muestras se sitúa en la provincia fitogeográfica Pampeana (Cabrera, 1971; Martínez Carretero *et al.*, 2016; Oyarzabal *et al.*, 2018) la cual

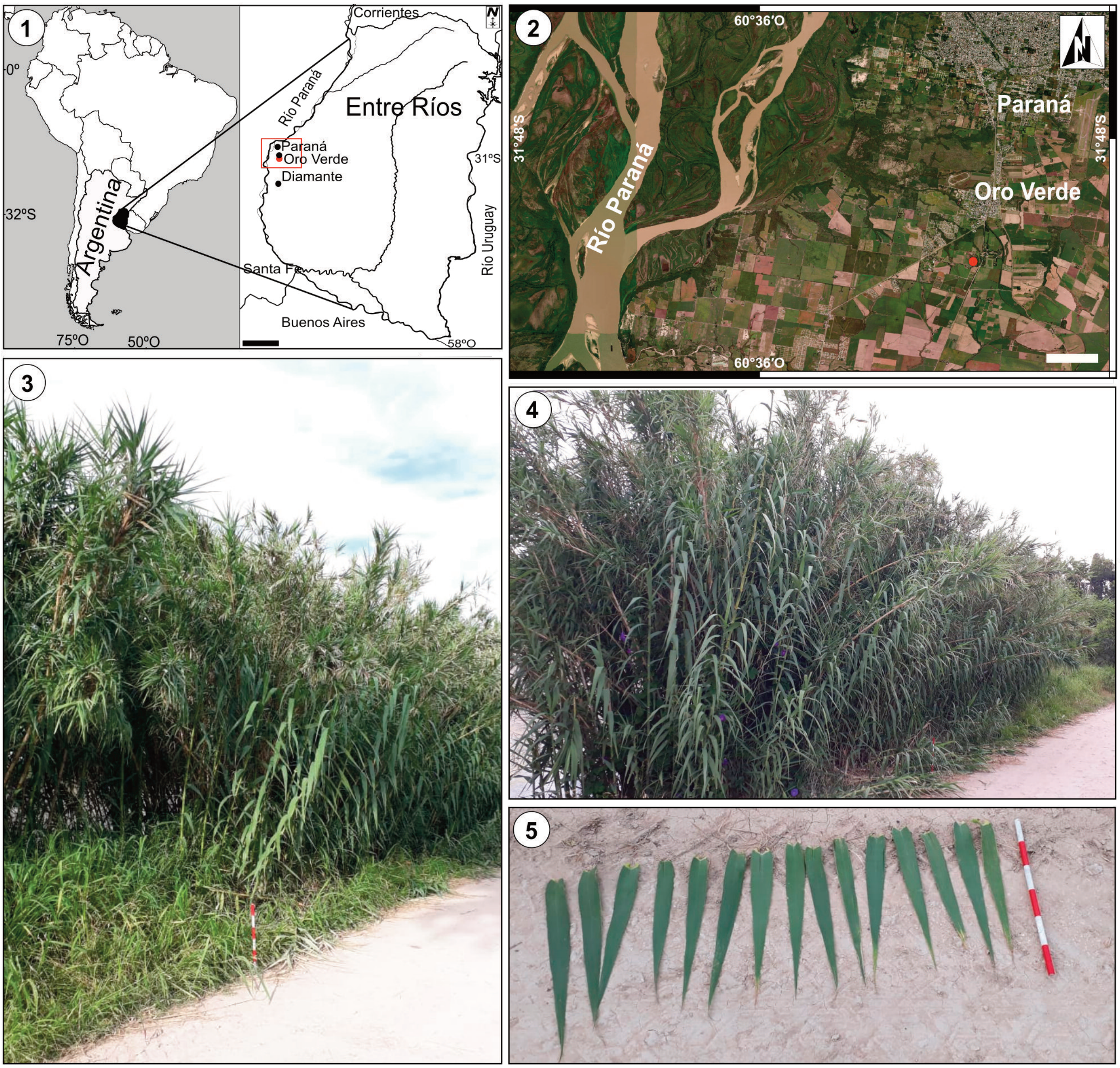


Figura 1. 1, Localización del área de estudio. Escala= 40 km; **2,** Imagen satelital del área de estudio, fuente Google Earth (acceso: 23 de marzo de 2023), punto rojo sitio de muestreo. Escala= 2 km; **3–4,** Vista del cañaveral; **5,** Hojas recolectadas para procesamiento. **3, 5** Escala= 1 m.

está caracterizada por sabanas, con especies de Poaceae que pueden alcanzar 1 m de altura, hierbas, arbustos, bosques tropicales estacionalmente secos, sabanas inundadas y bosques de galería a lo largo de los ríos (Cabrera y Willink, 1973; Dinerstein *et al.*, 1995).

El clima de la Provincia de Entre Ríos es del tipo templado húmedo, con variables climáticas graduales de Norte a Sur, dónde las precipitaciones anuales varían de 1.400 mm a 1.000 mm, la temperatura media anual disminuye de Norte a Sur de 19 °C a 17,5 °C. El sitio de muestreo localizado en la ciudad de Oro Verde presenta valores en precipitaciones medias anuales de 1.081 mm y temperaturas medias anuales de 18,7 °C, fuente de datos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Cravero *et al.*, 2017).

Trabajo de campo

El criterio metodológico a campo fue obtener hojas de *A. donax* de un mismo cañaveral, tomando las muestras a igual altura con respecto al nivel del suelo y analizando la zona media de la hoja para respetar el proceso de silicificación. El cañaveral posee un área de 80 m^2, con una longitud de 20 m, 4 m de ancho y 7 m de altura en toda la unidad de vegetación, las muestras se colectaron a 3,5 m de altura y de manera equidistante a lo largo de un transecto que abarca la unidad de vegetación en su totalidad (Fig. 1.3–4). Para llevar a cabo esta investigación, se recolectaron un total de 15 hojas procedentes de distintas cañas. De ese conjunto, se escogieron cinco hojas de tamaño similar para su procesamiento (Fig. 1.5). Las hojas restantes se conservaron como reserva en caso de que se perdiera algún material vegetal durante los ciclos de calcinación.

Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio inició con el pretratamiento de las cinco hojas seleccionadas, esto consistió en un lavado utilizando agua destilada y la aplicación de solución al 2% de detergente de laboratorio a cada muestra, seguido de ello, se secó el material en estufa a 50 °C. Cada muestra de hoja fue separada en cuatro submuestras de un gramo para posteriormente calcinarlas en diferentes rangos térmicos. El procedimiento de calcinación incluye una etapa previa de carbonización a 200 °C durante dos horas. Posteriormente, se lleva a cabo una digestión química con ácido clorhídrico 5 mol/litro (HCl 5N). Estos pasos resultan importantes para eliminar metales alcalinos, alcalinos-térreos bajo la forma soluble de cloruros (Labouriau, 1983).

El proceso de calcinación se aplicó en cada hoja utilizando cuatro temperaturas específicas en un tiempo determinado, 500 °C durante cuatro horas, 650 °C, 800 °C y 950 °C por un lapso de dos horas. El tiempo de calcinación fue el mínimo necesario para generar las cenizas resultantes de dicho procesamiento. El rango térmico de 500 °C no logró calcinar la totalidad el material vegetal a procesar, por ello se duplicó el tiempo establecido inicialmente de dos horas. Las cenizas resultantes fueron montadas en medio líquido con aceite de inmersión y medio fijo en bálsamo de Canadá, para observación a microscopio óptico Nikon Eclipse E200. Las cenizas y muestras microscópicas se incorporaron a la colección y repositorio definitivo en el laboratorio de paleobotánica del Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la Producción (CICYTTP-CONICET), Diamante, Entre Ríos (Zucol *et al.*, 2014) asignándole los números de identificación 833–837 (rango térmico 500 °C), 848–852 (rango térmico 650 °C), 863–867 (rango térmico 800 °C) y 920–924 (rango térmico 900 °C).

Análisis de asociación fitolítica y estudios morfométricos

Se contabilizaron 350 silicofitolitos por muestra y se definió la asociación fitolítica, lo cual consistió primeramente en cuantificar los morfotipos fitolíticos y luego expresar esto en valores de abundancia relativa, considerando una escala que abarca desde la ausencia de los silicofitolitos de una determinada clase morfológica, a su presencia en forma rara, escasa, frecuente o muy frecuente.

La ausencia se representa por el 0% de frecuencia relativa, el valor máximo de la escala (D) es igual al valor de clase morfológica que posee la mayor frecuencia relativa. Los silicofitolitos contabilizados como raros son aquellos que poseen valores de frecuencia relativa superiores al 0% y que no superan el límite A, siendo A= 0,1 x D. Por otro lado, los morfotipos escasos son aquellos considerados a partir de valores de frecuencia relativa iguales o superiores al valor A y que no superan el límite B, siendo B= 0,3 x D. Los silicofitolitos frecuentes se establecen a partir de valores de

frecuencia relativa iguales o superiores a B, y que no superan el límite de C, siendo C= 0,6 x D. Finalmente los elementos que poseen frecuencias relativas entre C y D se han considerado como muy frecuentes (Zucol, 1996).

Adicionalmente, se registró la presencia de morfotipos alterados en cada muestra de hoja procesada a 950 °C, los cuales presentaban señales de desgaste y/o cambios de coloración. Estos resultados se expresaron en forma de porcentaje con respecto al recuento total en cada muestra. A continuación, por presentarse muy frecuente en todas las muestras, fueron seleccionados los morfotipos BILOBATE para realizar los estudios morfométricos. Los morfotipos fitolíticos fueron fotografiados con cámara Nikon Coolpix S4, con un aumento de 400x (10x de ocular y 40x de objetivo) y microscopio electrónico de barrido PHENOM PRO. Por otra parte, los silicofitolitos se determinaron y clasificaron según los descriptores propuestos por el Código Internacional de Nomenclatura de Fitolitos 2.0 (Neumann *et al.*, 2019), Bertoldi de Pomar (1971) y la clasificación mediante acrónimos propuesta por Patterer *et al.* (2011) (Tab. 1). Por cada muestra de hoja se analizaron 30 morfotipos por procesamiento térmico, tomando fotografías de 150 BILOBATE por rango térmico, obteniendo un total de 600 silicofitolitos analizados.

Se tomaron medidas morfométricas propuestas por el ICPM (Ball *et al.*, 2016) de tamaño como longitud máxima dentro del fitolito, ancho de cabezuela, perímetro, área, perímetro convexo y área convexa (Fig. 2). Posteriormente, se analizaron variables como factor de forma, redondez, convexidad, solidez y relación de aspecto (Tab. 2). Las mediciones se llevaron a cabo mediante el *software* ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Este *software* permite realizar diferentes medidas como también otros aspectos dimensionales de los objetos microscópicos analizados a partir de fotografías.

TABLA 1 – Silicofitolitos utilizados en este trabajo.

Acrónimo[a]	Breve descripción	Grupo[b]	Denominación propuesta por ICPN[c]
Mp	Elementos prismáticos, elongados, de contorno levemente ensanchado, liso y/o festoneado.	Elongado	ELONGATE
Fl	Elementos en forma de abanico.	Flabelos	BULLIFORM FLABELLATE
Ha	Elementos originados a partir de células cortas en forma de halterios.	Bilobados	BILOBATE
Ph	Elemento halteriforme plurilobado.	Plurilobados	POLYLOBATE
Ch	Elementos originados a partir de células cortas, formados por cuatro lóbulos.	Cruces	CROSS

Referencias: **a,** Patterer *et al.* (2011); **b,** Bertoldi de Pomar (1971); **c,** Neumann *et al.* (2019)

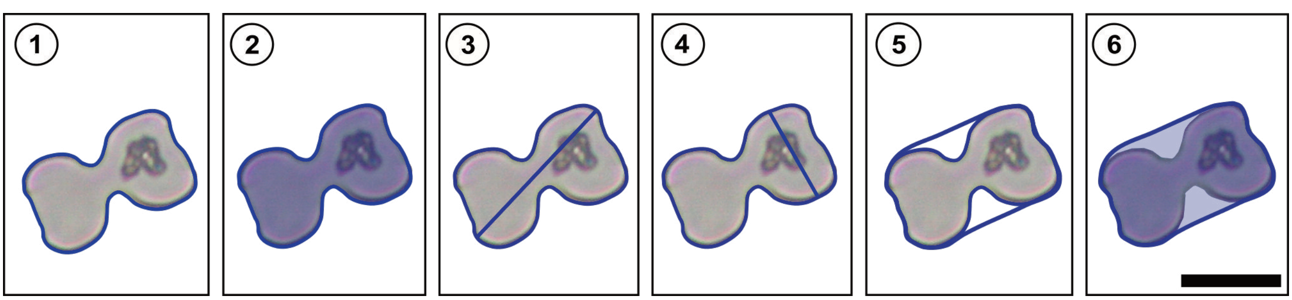


Figura 2. Medidas de tamaño de un silicofitolito BILOBATE según se describe en la Tabla 2, basadas en las variables propuestas por Ball *et al.* (2016). **1,** perímetro; **2,** área; **3,** longitud máxima dentro del silicofitolito; **4,** ancho de cabezuela; **5,** perímetro convexo; **6,** área convexa. Escala= 20 μm.

TABLA 2 – Lista de variables morfométricas calculadas para cada silicofitolito.

Tipo	Nombre	Descripción
Tamaño	Área	Área simple del fitolito.
	Área convexa	Área dentro de una cuerda tensa alrededor del fitolito.
	Perímetro	Longitud del límite del fitolito.
	Perímetro convexo	Longitud de una cuerda tensa alrededor del fitolito.
	Longitud	Cordón más largo dentro del fitolito.
	Ancho	Dimensión menor del fitolito. Calculada como el diámetro del orificio más pequeño por el que este puede pasar.
Forma	Factor de forma	Es igual a $4 \times$ Área $\times \pi$/Perímetro^2; es 1,0 para un círculo perfecto y disminuye para las formas irregulares.
	Redondez	Es igual a $4 \times$ Área/$\pi \times$ Longitud^2; es 1,0 para el círculo perfecto y disminuye con el alargamiento del fitolito.
	Convexidad	Relación entre el perímetro convexo y el perímetro; es 1,0 para una forma perfectamente convexa, disminuye si hay hendiduras en la superficie.
	Solidez	Relación entre el área y el área convexa; es 1,0 para una forma perfectamente convexa, disminuye si hay hendiduras en la superficie.
	Relación de aspecto	Es igual a la longitud/anchura.

El mínimo necesario de silicofitolitos para analizar en cada muestra se calculó siguiendo la fórmula de Ball *et al.* (1996), asegurando un nivel de confianza del 90% (Tab. 3).

$$N_{min} = Z^2_{\alpha/2} \times S^2 / (ME)^2$$

Dónde N_{min} es el tamaño mínimo de la muestra, $Z^2_{\alpha/2}$= 1,64, que es el cuadrado del valor de dos colas en α= 0,10, S^2 es la varianza, y $(ME)^2$ es el cuadrado del margen de error deseado, que es aquí el producto entre 0,05 y la media de la muestra.

Análisis estadísticos

La asociación fitolítica se representó por medio de histogramas sobre la base de datos de recuento fitolítico en valores de frecuencia relativa (Fig. 4.1–2). El análisis estadístico se realizó, por un lado, con el programa PAST (PAleontological STatistics; Hammer *et al.*, 2007), llevándose a cabo los análisis estadísticos descriptivos de cada variable morfométrica en su respectivo tratamiento térmico (Tab. 4) y su resumen gráfico mediante diagramas de cajas (Fig. 5).

Posteriormente, mediante el *software* estadístico IBM SPSS (IBM Corp. Released, 2021), se realizó un análisis estadístico para evaluar las diferencias entre medias de las variables morfométricas aplicadas en relación con los rangos térmicos utilizados durante la etapa de calcinación. Para ello, se realizó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) utilizándose la prueba de Tukey como test *a posteriori* en aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas entre medias. Todas las pruebas estadísticas se realizaron en un umbral de significación de α= 0,05 (Fig. 5).

Prospección del índice de refracción en silicofitolitos y análisis de MEB-EDX

Se analizó la variación del IR de silicofitolitos (poseen un valor medio de 1,458 según Teruggi, 1955; Jones y Beavers, 1963) procesados a diferentes temperaturas de calcinación mediante la prospección de línea de Becke (Head, 1962). Esta técnica consiste en sumergir la partícula en estudio, en este caso silicofitolito, en un líquido con un IR conocido. Como se mencionó anteriormente, los preparados microscópicos se realizaron con aceite de inmersión para preparados líquidos y bálsamo de Canadá para preparados fijos, estos con un IR de 1,518 y 1,534 respectivamente (Zucol y Osterrieth, 2002).

TABLA 3 – Resultados de las pruebas para el tamaño mínimo de muestra (N_{min}).

Variables morfométricas de tamaño	N_{min}	Variables morfométricas de forma	N_{min}
Área convexa	56,57	Redondez	23,73
Área	55,2	Relación de aspecto	19,58
Longitud	20,85	Factor de forma	10,36
Ancho	19,65	Solidez	2,22
Perímetro	18,08	Convexidad	1,11
Perímetro convexo	14,91	-	-

Durante la visualización de los morfotipos fitolíticos en microscopio óptico se percibe, por la reflexión y refracción de la luz, una línea en el contorno de los biominerales cuando estos son enfocados nítidamente; esto se denomina línea de Becke. Cuando se desenfoca el material (se genera una distancia mayor entre el objetivo y la muestra), la línea se traslada al medio donde se encuentre un mayor IR. De este modo, el IR del silicofitolito puede compararse con el medio de montaje y determinar si aumenta o disminuye al analizar la línea de Becke. Cuando un silicofitolito aumenta su IR, este tendrá menor contraste en el medio de montaje y, por otro lado, si su IR no se ve alterado, mantendrá un contorno con contraste nítido y una marcada línea de Becke.

A modo complementario, se analizó la composición atómica elemental de silicofitolitos mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) PHENOM PRO asociado a un sistema de EDX. Se aplicó la técnica analítica MEB-EDX, utilizando un haz primario de 15 KeV con el objetivo de caracterizar los componentes atómicos elementales en la superficie de los silicofitolitos.

RESULTADOS

Descripción fitolítica foliar de *Arundo donax* L.

Los silicofitolitos en hoja de *A. donax* se pudieron describir basándose en su morfología y características específicas según los descriptores propuestos por el Código Internacional de Nomenclatura de Fitolitos 2.0 (Neumann *et al.*, 2019). La asociación fitolítica se caracterizó por ELONGATE, encontrándose aquellos que poseen morfología tabular con márgenes sinuosos, alternando convexidades y concavidades, y morfotipos alargados dendríticos que suelen tener ramificaciones que se extienden lateralmente alejándose de ambos lados más largos. Además, se pueden observar procesos que se extienden lateralmente desde los extremos del fitolito (Fig. 3.1). Cabe destacar que estos morfotipos también pueden exhibir márgenes lisos con un grosor delgadamente tabular (Fig. 3.2).

Además, se encontraron morfotipos del tipo BULLIFORM FLABELLATE, los cuales presentan en su contorno superior un margen convexo facetado, en cambio el extremo inferior es notablemente más estrecho, el cual puede ser recto a cóncavo. Para el caso de *A. donax*, este tipo de silicofitolito se puede encontrar en toda la epidermis adaxial de las hojas y poseen un arreglo en forma de abanico de variaciones en el margen superior con dos o tres extremos cóncavos (Chauhan *et al.*, 2011).

En referencia a los silicofitolitos de menor tamaño que se encuentran en *A. donax,* Neumann *et al.* (2019) caracterizan a BILOBATE como aquellos morfotipos formados por dos lóbulos separados mediante un vástago. Por otro lado, CROSS posee un eje largo ancho que separa a típicamente cuatro lóbulos. Finalmente, POLYLOBATE posee uno o más lóbulos adicionales claramente separados insertados entre dos lóbulos primarios (Neumann *et al.*, 2019).

La disposición de morfotipos articulados se puede describir según Ellis (1979). Para el caso de ELONGATE articulados, estos se componen de células largas interestomáticas con extremos cóncavos dispuestas en las mismas filas horizontales que las estructuras estomáticas. Los silicofitolitos BILOBATE articulados se encuentran en filas horizontales

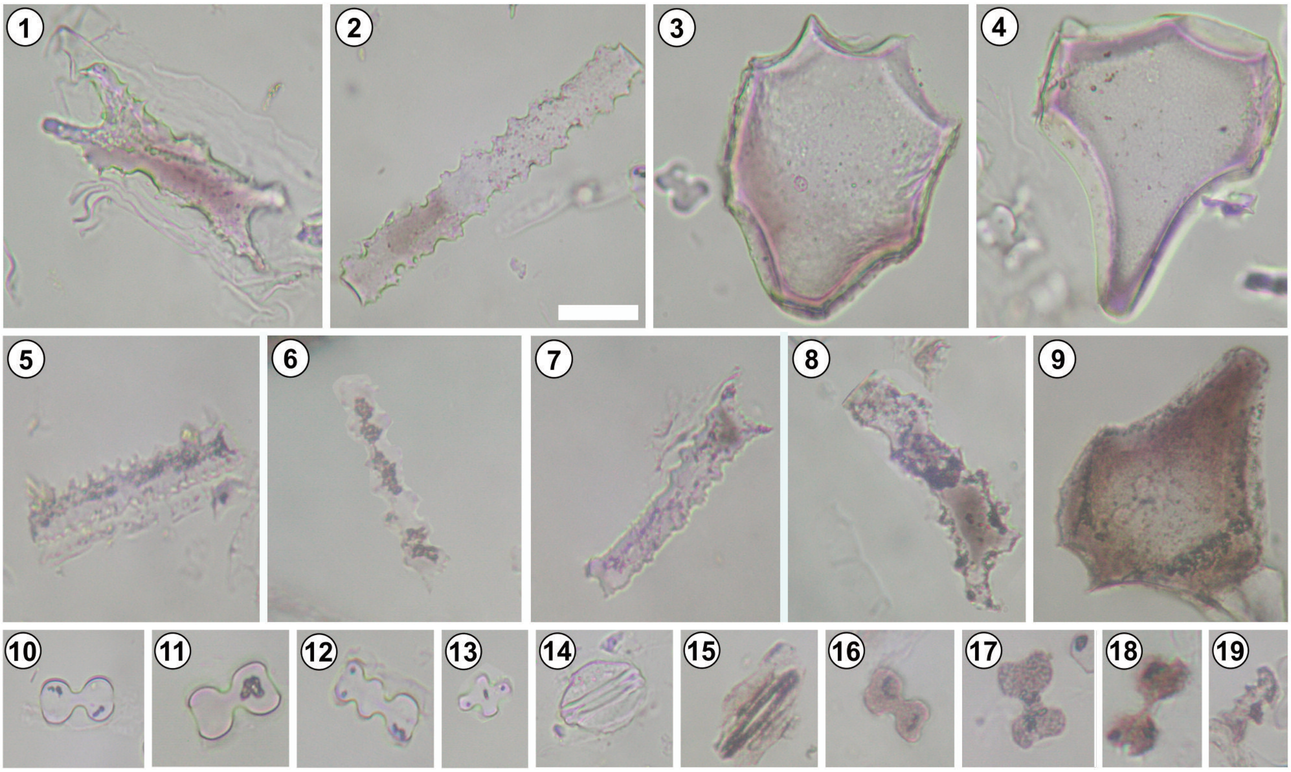


Figura 3. Asociación fitolítica en hojas de ***Arundo donax*** L. **1–2,** ELONGATE; **3–4,** BULLIFORM FLABELLATE; **5–8,** ELONGATE alterados; **9,** BULLIFORM FLABELLATE de color oscuro; **10–11,** BILOBATE; **12,** POLYLOBATE; **13,** CROSS; **14,** Estoma; **15,** Estoma parcialmente de color oscuro; **16–18,** BILOBATE oscuros; **19,** POLYLOBATE oscuro. Escala= 20 μm.

adyacentes a células largas de márgenes ondulados. En tanto, BULLIFORM FLABELLATE se asocian entre sí conformando morfotipos articulados.

La variabilidad fitolítica en hojas de *A. donax* (Fig. 4.1) permitió establecer la caracterización de la misma de acuerdo a la abundancia de elementos tales como morfotipos ELONGATE (Mp03-Mp04-Mp05) y BULLIFORM FLABELLATE (Fl01-Fl04-Fl07-Fl08) presentándose ambos de manera escasa a rara en algunas muestras. Por su parte, entre los silicofitolitos de menor tamaño se presentaron muy frecuente y en todas las muestras los silicofitolitos BILOBATE (Ha01-Ha03-Ha09-Ha10); seguidos por CROSS (Ch01) y POLYLOBATE, escasamente representados. En la totalidad de las muestras pudo observarse, raramente, la presencia de estructuras estomáticas.

Los morfotipos articulados como ELONGATE y BULLIFORM FLABELLATE fueron contabilizados de manera rara, en cuanto morfotipos articulados BILOBATE se presentaron escasamente.

La variabilidad fitolítica se mantuvo tanto en abundancia como en diversidad en los procesamientos térmicos de 500 °C, 650 °C y 800 °C. Por su parte, el rango de 950 °C se caracterizó por un menor recuento de BILOBATE y CROSS, igualmente presentándose de manera muy frecuente y escasa, respectivamente, en relación con los demás morfotipos. Por otro lado, se presentó un mayor recuento de ELONGATE y BULLIFORM FLABELLATE (Fig. 4.1).

Los morfotipos articulados presentaron similar patrón de diversidad y abundancia en los tratamientos térmicos de 500 °C, 650 °C y 800 °C; en cambio, en muestras procesadas a 950 °C se notó una mayor abundancia de BULLIFORM FLABELLATE articulado, y una disminución de BILOBATE articulados en la totalidad de muestras procesadas a dicha temperatura. Los morfotipos ELONGATE articulados se mantuvieron en similares abundancias en todas las temperaturas de calcinación aplicadas (Fig. 4.1).

Las muestras procesadas a 950 °C fueron las únicas que generaron cambios en silicofitolitos tanto en coloración como en su forma y tamaño (Fig. 3.5–9, 3.15–19). Los morfotipos ELONGATE evidenciaron a simple vista cambios de forma acompañado de alteraciones en su coloración, en

TABLA 4 – Estadísticas descriptivas de las variables morfométricas aplicadas en BILOBATE extraídos en diferentes rangos térmicos.

		Variables de tamaño						Variables de forma				
		Longitud	Ancho	Perímetro	Área	Perímetro convexo	Área convexa	Factor de forma	Redondez	Convexidad	Solidez	Relación de aspecto
500 °C	Media	22,7	14,4	74,3	239,3	64,9	297,4	0,54	0,59	0,876	0,807	1,596
	Mínimo	13,5	8,2	47,9	94,9	43,1	123,4	0,42	0,412	0,808	0,711	1,058
	Máximo	33,5	20,7	110,6	446,2	91,5	587,5	0,88	0,969	1,161	0,885	2,182
	DS	3,9	2,6	12	67,2	9,4	85,7	0,058	0,097	0,038	0,032	0,226
650 °C	Media	22	14,2	74,1	225,5	63,8	284,7	0,512	0,599	0,865	0,794	1,581
	Mínimo	12,8	8,6	44,9	96,4	41,8	119	0,344	0,264	0,722	0,639	1,027
	Máximo	32,1	20,4	111,7	421,8	88,2	554,5	0,649	1,047	1	1	2,677
	DS	3,9	2,6	12,8	67,7	9,7	86,5	0,058	0,097	0,038	0,032	0,226
800 °C	Media	22,5	14,6	75,4	248,7	65,6	302,9	0,542	0,627	0,872	0,82	1,555
	Mínimo	14	7,6	42,6	78,6	38,1	101,3	0,423	0,382	0,804	0,719	1,088
	Máximo	33,1	20,8	104,1	474,5	87,4	521	0,698	0,938	1	1	2,439
	DS	3,5	2,4	11,3	69,9	9,3	80,4	0,005	0,009	0,003	0,004	0,02
950 °C	Media	22	14,7	70,9	237,5	63,4	285,7	0,591	0,637	0,897	0,836	1,512
	Mínimo	11,8	7,9	39,1	91,6	38	100,5	0,42	0,344	0,76	0,701	0,94
	Máximo	36	22,1	115,7	538,4	99,2	682,7	0,805	1,003	1	1	3,052
	DS	4,4	2,4	12,4	69,8	10,3	90,4	0,07	0,124	0,032	0,042	0,299

Abreviatura: DS, Desviación Estándar.

tanto morfotipos BILOBATE, POLYLOBATE, CROSS y BULLIFORM FLABELLATE demostraron cambios de coloración y desgaste superficial (Fig. 4.2). Los silicofitolitos ELONGATE presentaron cambios en su morfología con alteraciones a nivel de extremos cóncavos de morfotipos Mp05 mayoritariamente (Fig. 3.7–8), los elementos del tipo Mp03 evidencian cambios en la regularidad de sus contornos rugosos (Fig. 3.5–6). Por otra parte, BULLIFORM FLABELLATE presentan cambios de coloración (Fig. 3.9) principalmente. En el caso de silicofitolitos BILOBATE se observó cambios de tamaño y forma, identificables mediante los análisis morfométricos propuestos que se desarrollarán a continuación, además de cambios en su coloración y desgaste superficial mencionado anteriormente (Fig. 3.16–18).

Mediante el análisis de línea de Becke, se logró establecer que silicofitolitos procesados entre 500 °C y 800 °C no presentaron diferencias en su IR, manteniendo un contorno nítido y una visible línea de Becke al enfocar el morfotipo; en cambio, muestras procesadas a 950 °C demostraron un aumento del IR ya que se dificulta observar el contorno de los morfotipos, y se visualiza una línea de Becke difusa. Probablemente los cambios de coloración incidan en variaciones de IR en silicofitolitos procesados en el mayor rango de temperatura.

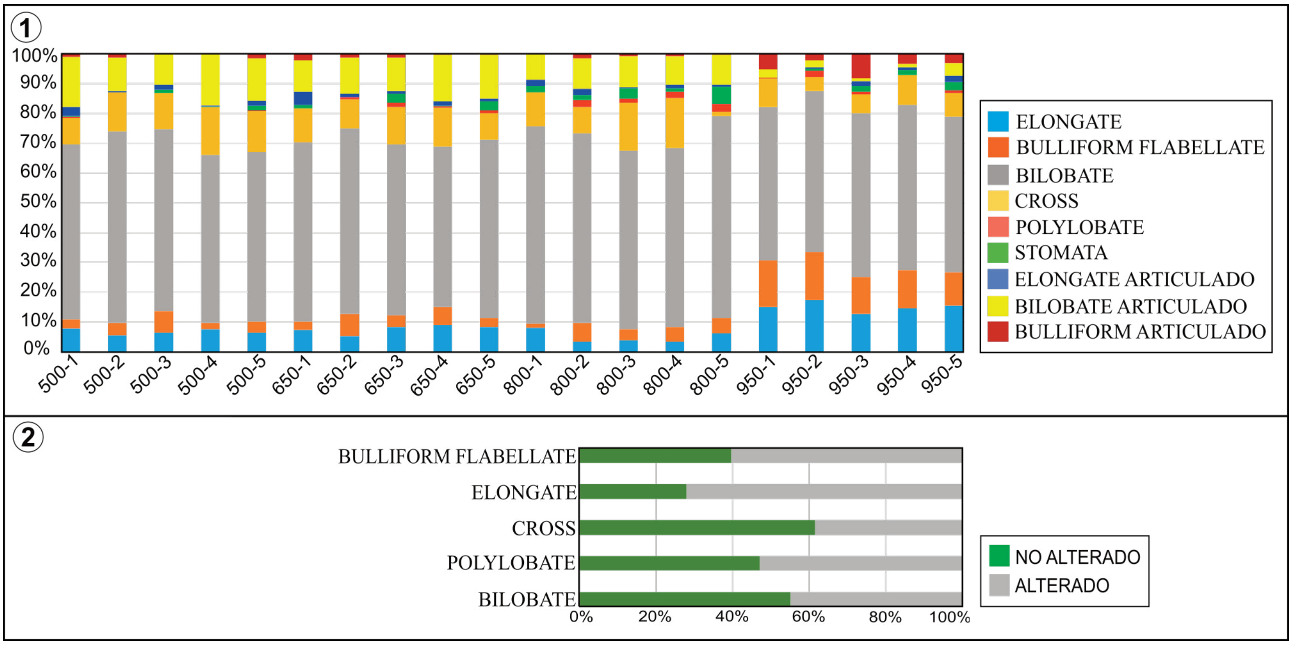


Figura 4. 1, Asociación fitolítica de muestras procesadas a diferentes temperaturas de calcinación; **2,** Estado de conservación de silicofitolitos extraídos a 950 °C en proceso de calcinación.

Resultados de mediciones morfométricas

El análisis del número mínimo de silicofitolitos necesarios para estudiar las variables morfométricas propuestas indicaron que se necesitan, en la mayoría de los casos, una media de 30 silicofitolitos por muestra. Por otro lado, las variables de área requirieron de 60 morfotipos aproximadamente (Tab. 3). Si bien en el presente estudio se midieron 30 morfotipos por muestra, siendo analizados 150 por tratamiento térmico y un total de 600 silicofitolitos, se comprende que este tamaño muestral resultó óptimo por las réplicas en cantidad de hojas procesadas por rango térmico, indicando un conjunto de datos representativo.

En el presente estudio hemos recopilado datos sobre parámetros de tamaño como longitud, ancho, área, perímetro, área convexa y perímetro convexo; y descriptores de forma como la relación de aspecto, factor de forma, redondez, convexidad y solidez en morfotipos BILOBATE en hojas de *A. donax*. Los datos morfométricos de los descriptores de tamaño presentaron cambios considerables de perímetro en silicofitolitos procesados a 950 °C, con una diferencia de 4 μm de valor medio con los restantes tratamientos térmicos. En cuanto a los descriptores de forma, estos asignaron valores cuantitativos susceptibles de comparación; por ejemplo, silicofitolitos procesados a 950 °C presentaron mayores valores de factor de forma, redondez, convexidad y solidez, siendo 0,59, 0,63, 0,89 y 0,83 respectivamente (Tab. 4; Fig. 5).

Los resultados obtenidos mediante ANOVA revelaron cambios significativos en las medias de la mayoría de las variables morfométricas analizadas en relación con los distintos rangos térmicos utilizados en la etapa de calcinación. Específicamente, se observaron diferencias significativas en el perímetro (p= 0,0081), área (p= 0,0342) y en todas las demás variables de forma estudiadas, factor de forma (p= 3,57E-25), redondez (p= 0,0008), convexidad (p= 2,59E-15), solidez (p= 5,62E-15) y relación de aspecto (p= 0,0373). La prueba de Tukey revela diferencias significativas, destacándose principalmente la existente entre el rango térmico de 950 °C y las restantes temperaturas aplicadas.

Esta diferencia resulta notable en la variable de tamaño de perímetro, así como en las variables de forma, como el factor de forma, la redondez, la convexidad, la solidez y la relación de aspecto. Aunque existen casos en los que otros rangos térmicos difieren del resto, únicamente el rango más alto de temperatura demuestra diferencias significativas en las variables morfométricas mencionadas. Es importante

destacar que la variable de tamaño de área mostró medias similares en los tratamientos térmicos de 500 °C y 950 °C (Fig. 5).

La visualización de morfotipos fitolíticos en MEB demostró evidencias de desgaste superficial en silicofitolitos calcinados a 950 °C (Fig. 6.5–8, 6.10) diferenciándose de los tratados a temperaturas menores a 950 °C (Fig. 6.1–4, 6.9). Esto se vió reflejado en diferentes distorsiones superficiales como mayor rugosidad, porosidad (Fig. 6.5–6, 6.10), variación de contornos y ruptura de diferentes estructuras. En el caso de BILOBATE se denotó un cambio superficial con mayor rugosidad y variación en sus contornos. Por otra parte, morfotipos del tipo ELONGATE demostraron cambios de forma fácilmente identificables como ruptura de procesos

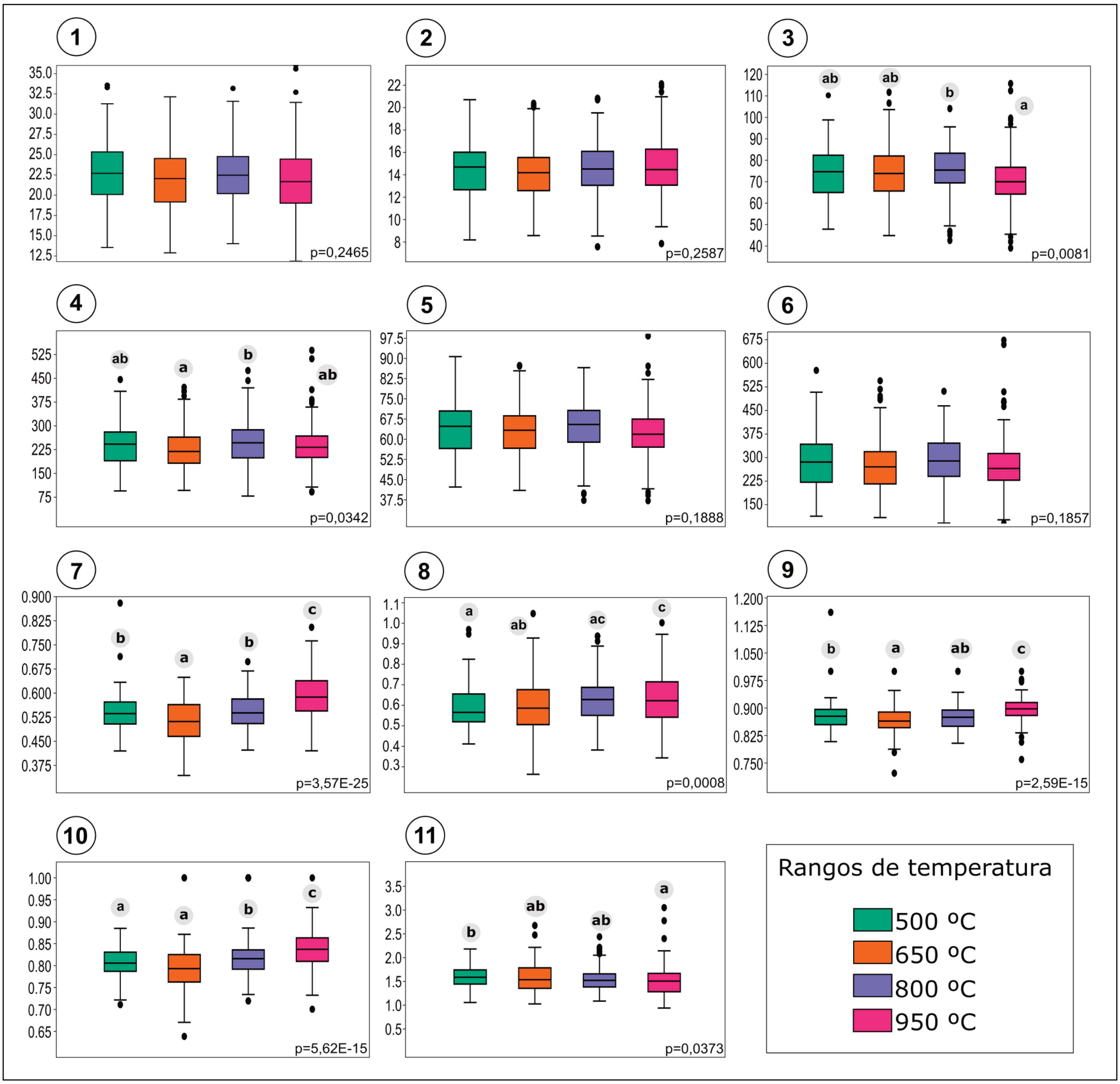


Figura 5. Diagrama de caja con mediana, percentil y rangos para cada variable morfométrica analizada de tamaño y forma de BILOBATE en hojas de ***A. donax*** L. El valor de *p* obtenido mediante el análisis de ANOVA se muestra en el extremo inferior derecho de cada figura, mientras que la presencia de letras diferentes indica diferencias significativas entre las medias según la prueba de Tukey. **1,** longitud; **2,** ancho de cabezuela; **3,** perímetro; **4,** área; **5,** perímetro convexo; **6,** área convexa; **7,** factor de forma; **8,** redondez; **9,** convexidad; **10,** solidez; **11,** relación de aspecto.

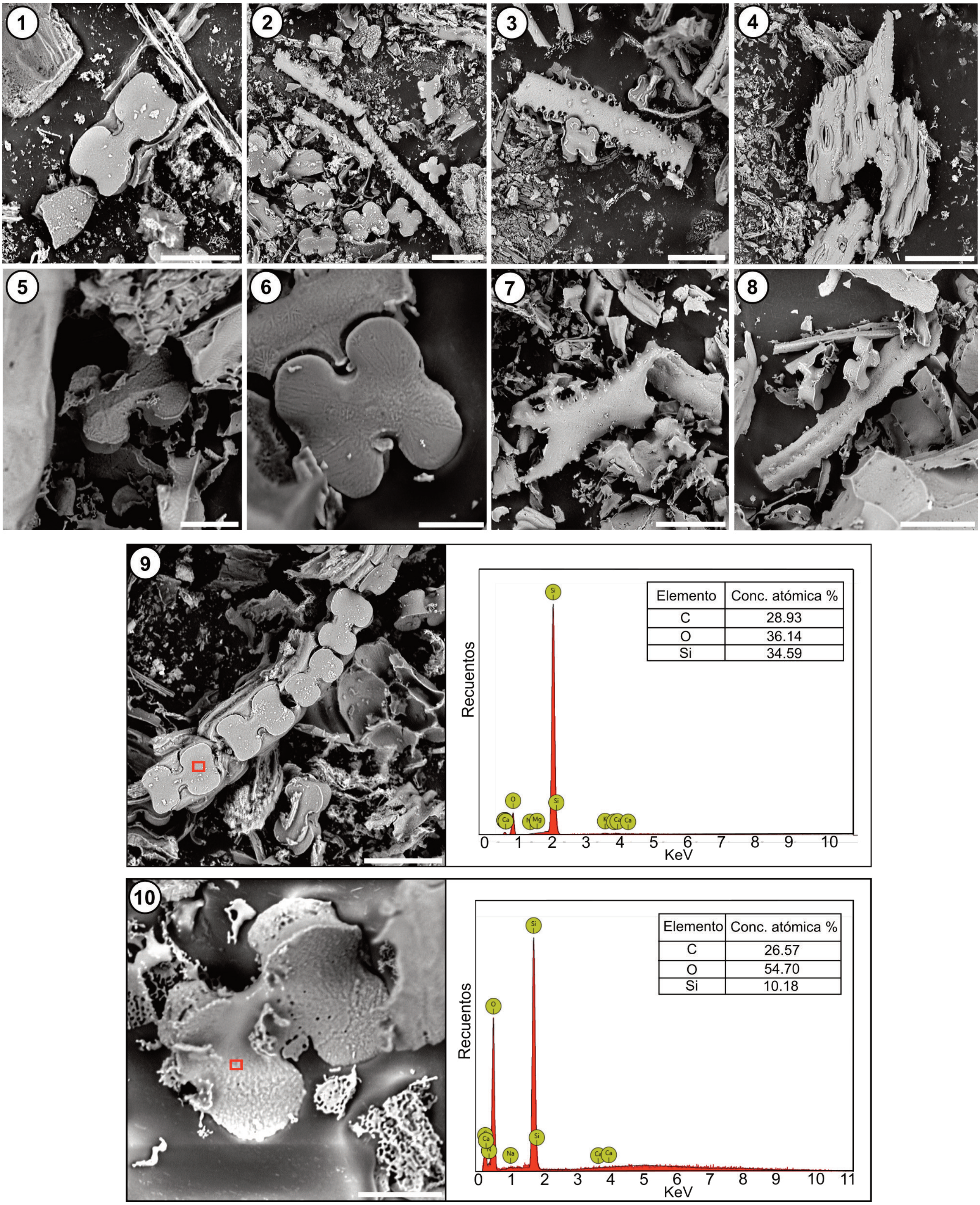


Figura 6. Silicofitolitos calcinados en temperaturas menores a 950 °C. **1,** BILOBATE; **2–3,** ELONGATE; **4,** ELONGATE articulado. Silicofitolitos calcinados a 950 °C; **5–6,** BILOBATE desgastados; **7–8,** ELONGATE desgastados. Análisis EDX en superficie de silicofitolito (recuadro rojo). **9,** BILOBATE extraído a temperaturas menores de 950 °C; **10,** BILOBATE extraído a 950 °C en etapa de calcinación. Escala= 20 μm.

en sus extremos y variación de contornos en sus márgenes (Fig. 6.7–8).

El análisis de EDX muestran la presencia de carbono (C), oxígeno (O) y sílice (Si) como los principales elementos constituyentes de los morfotipos fitolíticos (Fig. 6.9–10). La composición en valores atómicos de dichos elementos marcados en un área específica de BILOBATE demostró que, silicofitolitos extraídos a temperaturas menores de 950 °C indicaron valores atómicos porcentuales de elemento C= 28,93%; O= 36,15%; Si= 34,59% (Fig. 6.9). En tanto, los morfotipos calcinados a 950 °C presentaron valores de elemento C= 26,57%; O= 54,70%; y Si= 10,18% (Fig. 6.10). No obstante, la abundancia comparativa de sílice siempre resulta superior a los otros elementos.

DISCUSIÓN

Según nuestros hallazgos, es posible realizar una discriminación cuantitativa de los silicofitolitos extraídos de hojas de *A. donax* al analizar su abundancia fitolítica, tamaño y forma, mediante la aplicación de diversos rangos de temperatura en la etapa de calcinación.

En cuanto a diferencias cualitativas, se evidenciaron cambios en la preservación de los silicofitolitos en aquellas muestras procesadas a 950 °C, caracterizados por morfotipos alterados y con diferente coloración. Estos cambios se pueden atribuir en aumentos en el índice de refracción de dichos elementos, ya que, mediante la prospección de línea de Becke, dichos morfotipos poseen contornos poco nítidos con una línea de Becke que tiende a equipararse con el líquido de montaje indicando un mayor aumento de IR del morfotipo fitolítico.

Los silicofitolitos ELONGATE fueron los que presentaron alteraciones de manera significativa a simple vista, ya que sus contornos y extremos se encuentran con deformaciones. Por el lado de los BILOBATE, se observaron cambios mediante análisis morfométricos, ambos acompañados de variaciones en su coloración y alteraciones notorias con respecto a su superficie y contornos (Tab. 4; Figs. 5, 6.5–8, 6.10). En cuanto al resto de los morfotipos de la asociación fitolítica, se visualizan cambios de coloración generando dificultad en el recuento fitolítico. Vale destacar que se han observado BILOBATE en todos los rangos de temperatura, siendo menor su presencia en el rango de temperatura de 950 °C, resultando dificultoso encontrar aquellos morfotipos prístinos para realizar correctas tomas de mediciones.

Con respecto a las medidas obtenidas, aunque hay un considerable solapamiento en el rango de medias, mínimos y máximos, en las variables de forma analizadas se pueden diferenciar morfotipos que fueron calcinados a 950 °C, ya que presentaron valores medios mayores en variables como factor de forma, redondez, convexidad y solidez, en tanto en relación de aspecto presentaron valores bajos. Las variables de tamaño presentaron un valor de perímetro considerable para identificar que silicofitolitos fueron calcinados a 950 °C, siendo estos los más bajos. Además, la discrepancia en las mediciones obtenidas entre los BILOBATE extraídos a temperaturas más altas y los demás morfotipos se pudo verificar mediante ANOVA y, posteriormente, a través de la prueba de Tukey (Fig. 5).

Al utilizar la prueba de Tukey, se reveló un notorio incremento en los valores medios de las variables morfométricas, específicamente en relación con la forma. Asimismo, en cuanto a la variable de tamaño, se observó que el perímetro experimenta una disminución en sus valores medios. Además, al analizar el área de los silicofitolitos tratados, se identificó una destacada similitud entre las temperaturas de 500 °C y 950 °C. Aunque este hallazgo resulta significativo, se pueden apreciar de manera clara tendencias generales en las demás variables con respecto a los cambios de tamaño y forma.

La coloración de los silicofitolitos calcinados a 950 °C demostró variaciones en la totalidad de la superficie. Esto coincide con lo expuesto por Parr (2006), dónde aclara que bajo las condiciones oxidativas del fuego en altas temperaturas el color de los silicofitolitos puede verse alterado. Por otro lado, la coloración está relacionada con el índice de refracción de los silicofitolitos. Elbaum y Weiner (2003) indican que el efecto de la combustión sobre el índice de refracción de los morfotipos depende exclusivamente del tiempo y la temperatura de calentamiento, cuanto más alta es la temperatura, más fuerte es el efecto; expresan que a temperaturas de 700 °C y 1.000 °C se evidencian cambios significativos en la coloración de los morfotipos, es decir, en su índice de refracción. Los autores detallan que silicofitolitos expuestos a temperaturas entre 700 °C y 1.000 °C durante pocas horas se identifican fácilmente como quemado.

En este caso, nuestro trabajo demostró esto, ya que a temperaturas superiores a 900 °C durante dos horas en el procesamiento de calcinación generó cambios en la coloración de los morfotipos.

En cuanto a características de forma y tamaño, es importante destacar que valores elevados en variables de forma pueden estar indicando una tendencia de los silicofitolitos a una morfología específica. Según Ball *et al.* (2016), valores de factor de forma y redondez cercano a 1 indican una tendencia a un círculo perfecto. En este caso, los silicofitolitos procesados en el mayor rango de temperatura presentaron el valor más alto en ambas variables. En referencia a la superficie de los morfotipos BILOBATE analizados, valores como convexidad y solidez son indicativos de esto, cuando el valor de dichas variables es cercano a 1 indica una forma perfectamente convexa, y cuando esto disminuye, informa sobre hendiduras en la superficie (Ball *et al.*, 2016). En nuestro caso, las variables de convexidad y solidez presentaron los valores más altos en BILOBATE procesados a 950 °C.

Los resultados anteriormente descriptos se relacionan con las características visualizadas en los morfotipos BILOBATE mediante MEB. Por ejemplo, alteraciones superficiales y cambios en sus contornos de silicofitolitos BILOBATE se podrían vincular con valores de tamaño citados anteriormente, específicamente la reducción de perímetro. En cambio, la forma de BILOBATE visualizados en MEB no podría correlacionarse con valores altos en factor de forma, redondez, solidez y relación de aspecto. En este sentido, en trabajos futuros se podrían profundizar en una mayor prospección de muestras mediante MEB para vincular análisis morfométricos e imágenes capturadas en MEB. Con respecto a los valores de átomos elementales arrojados por el análisis MEB-EDX, morfotipos calcinados a 950 °C reflejaron una perdida notoria de sílice con valores que rondan el 10%, cuando sus valores normales oscilan el 30% (Payá *et al.*, 2018).

Aunque se trata de un estudio metodológico, estos resultados iniciales indican que el análisis morfométrico tiene el potencial de ser una herramienta eficaz para discriminar entre morfotipos BILOBATE calcinados por diferentes rangos de temperatura. Además, estas técnicas vinculadas a fotografías de MEB y estudios de composición atómica elemental mediante MEB-EDX pueden justificar cambios de tamaño y/o forma de morfotipos fitolíticos.

Para que sea de mayor aporte a los estudios de preservación de silicofitolitos, se requiere un mayor análisis morfométrico de una amplia variedad de especies procesadas no solo a diferentes temperaturas, sino también ante otros agentes químicos y físicos que aporten al estudio de procesos tafonómicos, obteniendo una mayor comprensión de los posibles medios que alteran estos microrrestos vegetales en diferentes contextos ambientales y no sólo metodológicos.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que el tamaño y forma de silicofitolitos BILOBATE extraídos a temperaturas de calcinación entre 500 y 800 °C no presentan cambios significativos. El material procesado a temperaturas que rondan los 950 °C, puede generar cambios de coloración de la sílice aumentando su índice de refracción, deformación de los contornos de los silicofitolitos, y cambios de su tamaño; específicamente en ELONGATE, esto es visible a simple vista, y en morfotipos BILOBATE, comprobable mediante morfometría geométrica. Esto se comprueba además con fotografías de MEB y análisis MEB-EDX expresado en cambios notorios de superficie y márgenes y pérdida de sílice en morfotipos procesados en el mayor rango térmico.

Es importante resaltar que, para evaluar cambios de tamaño y forma en trabajos metodológicos sobre extracción de silicofitolitos o procesos tafonómicos, debería tenerse en cuenta la selección de morfotipos específicos, probablemente no los más abundantes, sino aquellos que evidencian dichos cambios. En nuestro caso, los morfotipos ELONGATE podrían brindar una mejor información acerca de los cambios de forma y tamaño, lo cual puede ser propicio dependiendo del objetivo principal del trabajo en cuestión.

El análisis de silicofitolitos sirve como herramienta para la identificación taxonómica, estudios paleontológicos, arqueológicos y tafonómicos; por ello, resulta de suma importancia evaluar y definir procesamientos de laboratorio óptimos para no alterar los estudios posteriores. Ante esto, la morfometría geométrica brinda importante información a partir de la cuantificación de la morfología y las variaciones morfométricas de los fitolitos.

El presente estudio describe y caracteriza los límites óptimos de temperatura a la hora de calcinar material vegetal para extracción de silicofitolitos. Es por ello que un trabajo experimental inédito basado en el estudio de la respuesta de los morfotipos a diferentes temperaturas de calcinación resulta no solo un avance en el conocimiento de las propiedades de estos biominerales, sino también un avance en el entendimiento de la respuesta a los factores a que se ven sometidos los silicofitolitos en procesos tafonómicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por el proyecto PIP (Programa de Incentivos a los Investigadores) del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) 11220200100509CO.

REFERENCIAS

Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. y Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, *11*, 36–42.

Arana, M. D., Natale, E., Ferretti, N., Romano, G., Oggero, A., Martínez, G., Posadas, P. y Morrone, J. J. (2021). Esquema biogeográfico de la República Argentina. *Opera Lilloana*, *56*, 61–107.

Ball, T., Davis A. L., Evett, R., Ladwig, K., Tromp, M., Out, W. y Portillo, M. (2016). Morphometric analysis of phytoliths: recommendations towards standardization from the International Committee for Phytolith Morphometrics. *Journal of Archaeological Science*, *68*, 106–111.

Ball, T., Gardner, J. S. y Brotherson, J. D. (1996). Identifying phytoliths produced by the inflorescence bracts of three species of wheat (*Triticum monococcum* L., *T. dicoccon* Schrank, and *T. aestivum* L.) using computer-assisted image and statistical analyses. *Journal of Archaeological Science*, *23*, 619–632.

Ball, T., Vrydaghs, L., Mercer, T., Pearce, M., Snyder, S., Lisztes-Szabó, Z. y Peto, Á. (2017). A morphometric study of variance in articulated dendritic phytolith wave lobes within selected species of Triticeae and Aveneae. *Vegetation History and Archaeobotany*, *26*, 85–97.

Ball, T. B. y Brotherson, J. D. (1992). The effect of varying environmental conditions on phytolith morphometries in two species of grass (*Bouteloua curtipendula* and *Panicum virgatum*). *Scanning Microscopy*, *6*(4), 1163–1181.

Ball, T. B., Brotherson, J. D. y Gardner, J. S. (1993). A typologic and morphometric study of variation in phytoliths from einkhorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *Canadian Journal of Botany*, *71*, 1182–1192.

Ball, T. B., Ehlers, R. y Standing, M. D. (2009). Review of typologic and morphometric analysis of phytoliths produced by wheat and barley. *Breeding Science*, *59*, 505–512.

Beauvois, P. (1812). *Essai d'une Nouvelle Agrostographie*. Chez l'auteur.

Benvenuto, M. L., Honaine, M. F., Osterrieth, M. y Morel, E. M. (2015). Differentiation of globular phytoliths in Arecaceae and other monocotyledons: morphological description for paleobotanical application. *Turkish Journal of Botany*, *39*, 341–353.

Bertoldi de Pomar, H. (1971). Ensayo de clasificación morfológica de los silicofitolitos. *Ameghiniana*, *8*, 317–328.

Bowdery, D. (1989). Phytolith analysis: Introduction and applications. En W. Beck, A. Clarke y L. Head (Eds.), *Plants in Australian archaeology: Archaeology and material culture studies in anthropology* (vol. 1, pp. 161–186). Watson Ferguson & Company.

Boyd, M. (2002). Identification of anthropogenic burning in the paleoecological record of the Northern Prairies: a new approach. *Annals of the Association of American Geographers*, *92*, 471–487.

Cabrera, A. L. (1971). Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, *14*, 1–50.

Cabrera, A. L. y Willink, A. (1973). *Biogeografía de América Latina. Monografía 13, Serie de Biología.* Secretaria General de la OEA, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

Chauhan., D. K., Tripathi, D. K., Kumar, D. y Kumar., Y. (2011). Diversity, distribution and frequency-based attributes of phytolith in *Arundo donax* L. *International Journal of Innovations in Biological and Chemical Sciences*, *1*, 22–27.

Cooke, J., Degabriel, J. L. y Hartley, S. E. (2016). The functional ecology of plant silicon: geoscience to genes. *Functional Ecology*, *30*, 1270–1276.

Correll, D. S. y Johnston, M. C. (1970). *Manual of the vascular plants of Texas*. Texas Research Foundation.

Cravero, S. A. C., Bianchi, C. L., Elena, H. J. y Bianchi, A. R. (2017). *Clima de la Argentina. Mapas digitales mensuales de precipitaciones y precipitación menos evapotranspiración potencial. Adenda del Atlas Climático digital de la República Argentina*. Ediciones INTA.

Dinerstein, E., Olson, M., Graham, D. J., Webster, A. L., Primm, S. A., Bookbinder, G. y Ledec, M. P. (1995). *Una evaluación del estado de conservación de las ecorregiones de América Latina y el Caribe*. Banco Mundial–Fondo Mundial para la Naturaleza.

Elbaum, R. y Weiner, S. (2003). Detection of burning of plant materials in the archaeological record by changes in the refractive indices of siliceous phytoliths. *Journal of Archaeological Science*, *30*, 217–226.

Ellis, R. P. (1979). A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia*, *12*(4), 641–671.

Epstein, E. (2009). Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology*, *155*, 155–160.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. (2007). Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, *4*(1), 1–86.

Head, H. H. (1962). *Rutley's elements of mineralogy*. The Woodbridge Press, Ltd.

Hitchcock, A. S. (1951). *Man. Grasses U.S.* (ed. 2). U.S. Department of Agriculture.

IBM Corp. Released. (2021). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0.* IBM Corp.

Jones, R. L. y Beavers, A. H. (1963). Some mineralogical and chemical properties of plant opal. *Soil Science*, *96*, 375–379.

Jones, L. H. P. y Milne, A. A. (1963). Studies of silica in the oat plant. 1. Chemical and physical properties of the silica. *Plant and Soil*, *18*(2), 207–220.

Jones, J. B. y Segnit, E. R. (1969). Water in sphere-type opal. *Mineralogical Magazine*, *37*(287), 357–361.

Katz, O. (2019). Conflict and complementarity of paleontological and molecular chronologies. *Paleobiology*, *45*(1), 7–20.

Labouriau, L. G. (1983). Phytolith work in Brazil, A minireview. *The Phytolitarien Newsletter*, *2*(2), 6–11.

Lanning, F. C., Ponnaiya, B. W. X. y Crumpton, C. F. (1958). The chemical nature of silica in plants. *Plant Physiology*, *33*, 339–343.

Lu, H., Zhang, J., Wu, N., Liu, K.-b., Xu, D. y Li, Q. (2009). Phytolith

analysis for the discrimination of foxtail millet (*Setaria italica*) and common millet (*Panicum miliaceum*). *PLOS Global Public Health*, *4*, 4448.

Martínez Carretero, E., Faggi, A. M., Fontana, J. L., Aceñolaza, P., Gandullo, R., Cabido, M., Iriart, D., Prado, D., Roig, F. A. y Eskuche, U. (2016). Prodromus sinsistemático de la República Argentina y una breve introducción a los estudios fitosociológicos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, *51*(3), 469–549.

Moench, F. C. (1794). Methodus Plantas Horti Botanici et Agri Marburgensis: A Staminum Situ Describendi. *Marburgi Cattorum, in officina nova libraria academiae*, *1*, 1–207.

Neumann, K., Strömberg, C. A. E., Ball, T., Albert, R. M., Vrydagh, L. y Scott Cumming, L. (2019). International Code for Phytolith Nomenclature (ICPN) 2.0. *Annals of Botany Oxford*, *20*, 1–11.

Out, W. y Madella, M. (2016). Morphometric distinction between bilobate phytoliths from *Panicum miliaceum* and *Setaria italica* leaves. *Archaeological and Anthropological Sciences*, *8*(3), 505–521.

Out, W. A. y Madella, M. (2015). Towards improved detection and identification of crop by-products: morphometric analysis of bilobate leaf phytoliths of *Pennisetum glaucum* and *Sorghum bicolor*. *Quaternary International*, *434*, 1–14.

Oyarzabal, M., Clavijo, J., Oakley, L., Biganzoli, F., Tognetti, P., Barberis, I., Maturo, H. M., Aragón, R., Campanello, P. I., Prado, D., Oesterheld, M. y León, R. J. C. (2018). Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral*, *28*, 40–63.

Parr, J. F. (2006). Effect of fire on phytolith coloration. *Geoarchaeology: An International Journal*, *21*(2), 171–185.

Parr, J. F., Lentfer, C. J. y Boyd, W. E. (2001). A comparative analysis of wet and dry ashing techniques for the extraction of phytoliths from plant material. *Journal of Archaeological Science*, *28*, 875–886.

Patterer, N. I. (2014). Análisis fitolíticos de las principales especies de palmeras (Arecaceae) presentes en regiones subtropicales de América del Sur. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*, *49*, 491–502.

Patterer, N. I., Passeggi, E. y Zucol, A. F. (2011). Análisis fitolíticos de suelos del sudoeste de la Provincia de Entre Ríos (Argentina) como una herramienta para comprender sus procesos pedológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, *28*(1), 132–146.

Payá, J., Roselló, J., Monzó, J. M., Escalera, A., Santamarina, M. P., Borrachero, M. V. y Soriano, L. (2018). An approach to a new supplementary cementing material: *Arundo donax* straw ash. *Sustainability*, *10*, 4273.
https://doi.org/10.3390/su10114273.3390/su10114273

Pearsall, D. M. (1989). *Paleoethnobotany: A handbook of procedures*. Academic Press.

Pensiero, J. F. (1999). Las especies sudamericanas del género *Setaria* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana*, *37*, 37–151.

Piperno, D. R. (2006). *Phytoliths: A comprehensive guide for archaeologists and palaeoecologists*. Alta Mira Press.

Rovner, I. (1971). Potential of opal phytolith for use in paleoecological reconstruction. *Quaternary Research*, *1*, 343–359.

Rovner, I. (1972). Note on a safer procedure for opal phytolith extraction. *Quaternary Research*, *2*(4), 591.

Runge, F. (1998). The effect of dry oxidation temperatures (500–800 °C) and of natural corrosion on opal phytoliths. En J. D. Meunier, F. Colin y L. Faure-Denard (Eds.), *The phytoliths: Applications in earth science and human history* (p. 73). CEREGE.

Teruggi, M. E. (1955). Algunas observaciones microscópicas sobre vidrio volcánico y ópalo organógeno en sedimentos pampeanos. *Número 66 Notas del Museo de La Plata: Geología*, *66*, 17–26.

Wallis, L. (2003). An overview of leaf phytolith production patterns in selected northwest Australian flora. *Review of Palaeobotany & Palynology*, *125*, *2*01–248.

Wu, Y., Yang, Y. y Wang, H. (2014). The effects of chemical composition and distribution on the preservation of phytolith morphology. *Applied Physics A*, *114*, 503–507.

Zucol, A. F. (1996). Microfitolitos de las Poaceae argentinas: I. Microfitolitos foliares de algunas especies del género *Stipa* (Stipeae: Arundinoideae), de la Provincia de Entre Ríos. *Darwiniana*, *34*, 151–172.

Zucol, A. F. y Osterrieth, M. (2002). Técnicas de preparación demuestras sedimentarias para la extracción de fitolitos. *Ameghiniana*, *39*, 379–382.

Zucol, A. F., Brea, M., Passeggi, E. y Franco, M. J. (2014). Colecciones del laboratorio de paleobotánica y procesamiento de material sedimentario del CICYTTP- Diamante (CONICET), Entre Ríos, Argentina. *Boletín de la Asociación Latinoamericana de Paleobotánica y Palinología*, *14*, 71–82.

Zuloaga, F. O., Morrone, O., Davidse, G., Filgueiras, T. S., Peterson, P. M., Soreng, R. J. y Judziewicz, E. J. (2003). Catalogue of new world grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundionoideae and Danthonioideae. *Contributions from the United States National Herbarium*, *46*, 1–662.

doi: 10.5710/PEAPA.01.08.2023.470

Recibido: 25 de abril 2023
Aceptado: 1 de agosto 2023
Publicado: 23 de agosto 2023